



Актуганов Глеб Эдуардович

СВОЙСТВА ХИТИНАЗЫ
BACILLUS SP. 739 – АНТАГОНИСТА
ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

Специальность: 03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в институте биологии Уфимского научного центра
Российской Академии Наук.

Научный руководитель: – кандидат технических наук,
доцент Мелентьев А.И.

Научный консультант: - кандидат биологических наук
Усанов Н.Г.

Официальные оппоненты: - доктор химических наук,
профессор Жданов Р.И.

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник Юсупова Д.В.

Ведущее учреждение: - Башкирский государственный университет

Защита состоится «27» апреля 2000 г. в 14.30 часов на заседании
диссертационного совета К.053.29.19. при Казанском государственном универ-
ситете им. В.И.Ульянова – Ленина, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государст-
венного университета

Автореферат разослан «27» марта 2000 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
Кандидат биологических наук

А.Н.Аскарова

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КФУ



870082

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последнее время внимание исследователей все больше привлекают хитинолитические ферменты и микроорганизмы, их продуцирующие. Это вызвано, прежде всего, интересом к продуктам ферментативного гидролиза хитина. У данных соединений, представляющих собой растворимые хитоолигосахариды, была обнаружена высокая биологическая активность широкого спектра, что делает весьма перспективным их практическое применение в медицине, химии и биотехнологии (Максимов и др., 1997). Кроме того, непосредственный интерес представляют сами хитиназы и их продуценты в качестве возможных средств биологической защиты сельскохозяйственных растений от болезней, вызываемых различными грибными фитопатогенами (Sneh, 1981; Ordentlich et al., 1987; Weller, 1988). Первоначально это обосновывали тем, что хитиназа способна гидролизовать хитин - естественный компонент клеточной стенки большинства грибов (Mitchell, Alexander, 1961). Было обнаружено, что у высших растений данный фермент функционирует в качестве защитного агента или фактора стресса, индуцируемого при повреждениях, вызываемых фитопатогенами (Boller, 1985). Позднее, однако, выяснилось, что хитиназы растений играют значительно более сложную и до конца не изученную роль (Kafetzopoulos et al., 1995). В настоящее время для предупреждения болезней сельскохозяйственных культур, вызываемых фитопатогенными грибами, ведется интенсивный поиск микробных антагонистов, в том числе хитинолитических (Lim et al., 1991; Podile, Prakash, 1996; Pleban et al., 1997). Выявлено, что способность подавлять рост и развитие грибов-фитопатогенов у некоторых штаммов бактерий-антагонистов напрямую связана с синтезом хитиназы (Ordentlich et al., 1988; Shapira et al., 1989; Inbar, Chet, 1991). Кроме того, показано, что хитиназы усиливают действие антибиотиков на грибы и токсический эффект *Bacillus thuringiensis* по отношению к насекомым-вредителям (Lorito et al., 1994; Regev et al., 1996; Wiwat et al., 1996). Вместе с тем, в опытах *in vitro* бактериальные хитиназы значительно слабее подавляют рост грибов по сравне-

нию с хитиназами высших растений (Roberts, Selitrennikoff, 1988). Тем не менее, поиск перспективных продуцентов хитиназы среди бактерий продолжается. Хитиназы бацилл, в отличие от аналогичных ферментов других микроорганизмов, изучены не так подробно, несмотря на то, что данные бактерии считаются весьма перспективными в биологическом контроле болезней растений (Cook, Baker, 1983). Известно, что явление антагонизма бактерий рода *Bacillus* ко многим микроскопическим грибам обусловлено в первую очередь синтезом широкого спектра соединений антибиотической природы (Katz et al., 1977; Смирнов и др., 1982). Роль хитиназы в этом феномене остается неясной.

Последнее время появляется все больше публикаций, посвященных изучению свойств хитинолитических ферментов и особенностей их биосинтеза у бактерий рода *Bacillus* (Watanabe et al., 1990; Трачук и др., 1996; Wiwat et al., 1999). Тем не менее, общие сведения о бациллярных хитиназах, на наш взгляд, довольно скудны и тематически разнородны.

Целью настоящей работы являлось изучение физико-химических свойств хитиназы *Bacillus* sp. 739 и определение биологической роли данного фермента в проявлении антагонистических свойств исследуемого штамма к микроскопическим фитопатогенным грибам.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Изучить влияние условий культивирования и отдельных компонентов питательной среды на продукцию хитинолитического комплекса штаммом *Bacillus* sp. 739.
2. Провести очистку хитиназы и охарактеризовать гомогенность очищенного фермента с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях.
3. Исследовать основные физико-химические свойства очищенного препарата хитиназы и установить механизм его действия.
4. Изучить влияние препаратов хитиназы *Bacillus* sp. 739 различной степени очистки на способность ингибировать рост и развитие отдельных представителей фитопатогенных грибов.

Научная новизна. Определены условия максимальной продукции хитиназы штаммом *Bacillus* sp. 739 в жидкой культуре. Показано, что наибольший выход фермента обеспечивают мицелий гриба *Botrytis cinerea* и хитин-глюкановый комплекс из плодовых тел базидиомицетов *Armillariella mellea* и *Macrolepiota procera*. Впервые обнаружена способность *Bacillus* sp. 739 секретировать хитозаназу - фермент, родственный хитиназе. Установлена конститутивная способность исследуемого штамма к образованию внеклеточной β -1,3-глюканазы (ламинариназы), входящей в комплекс миколитических ферментов. Исследованы физико-химические свойства очищенного препарата хитиназы *Bacillus* sp. 739, подтверждена белковая множественность форм хитиназ, синтезируемых представителями рода *Bacillus*. Установлено, что по механизму действия фермент является экзо-хитиназой (хитобиозидазой). Впервые для бацилл проведено подробное исследование роли хитиназы в проявлении антигрибной активности к некоторым фитопатогенным грибам. Показано отсутствие взаимосвязи между литической активностью очищенной хитиназы *Bacillus* sp. 739 и ее способностью ингибировать ростовые процессы у фитопатогенных грибов.

Практическая значимость. Изучены условия максимальной продукции хитиназы штаммом *Bacillus* sp. 739, что может быть использовано при производстве как ферментных препаратов, так и биопрепарата Бациспектин, предназначенного для защиты злаковых культур от болезней, вызываемых фитопатогенными грибами (Пат. 1743019, Россия).

Апробация работы. Результаты работы докладывались на международной научной конференции «Микробное разнообразие: состояние, стратегия сохранения, экологические проблемы» (Пермь, 1996), на международной конференции «Молекулярная генетика и биотехнология» (Минск, 1998).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ.

Структура и объем работы. Диссертация включает введение, обзор литературы (1 глава), описание объектов и методов исследования (1 глава), экспериментальную часть и обсуждение результатов (3 главы), заключение, выводы

и список цитируемой литературы, содержащий 135 ссылок, из них 32 на русском языке. Работа изложена на 107 страницах машинописного текста и содержит 32 рисунка и 19 таблиц.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в течение 1995-1998 гг. в лаборатории прикладной микробиологии института биологии УНЦ РАН.

Объекты исследований. Основным объектом изучения являлся штамм *Bacillus sp. 739*, который был предложен в качестве биологической основы препарата Бациспектин (Пат. 1743019, Россия).

В качестве тест-объектов для анализа антигрибной и литической активности хитиназы в работе использовали местные изоляты фитопатогенных грибов *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Helminthosporium sativum* (*Bipolaris sorokiniana*) и *Alternaria alternata*, а также коллекционный штамм *F. culmorum* ВИЗР-227.

Среды. Штамм *Bacillus sp. 739* поддерживали на среде, включающей, г/л: агар – 16,0; коллоидный хитин – 5,0; пептон – 3,0; кукурузный экстракт – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; дистиллированная вода – до 1,0 л. При изучении влияния физико-химических факторов на продукцию хитиназы и для получения ферментного препарата *Bacillus sp. 739* использовали жидкую среду того же состава, содержащую 2,0 г (с/в) коллоидного хитина на литр среды. Исследуя влияние природы источника углерода на синтез хитиназы, в жидкую среду вместо коллоидного хитина вносили измельченные плодовые тела базидиомицетов или мицелий микроскопических грибов в концентрации 0,5%.

Для поддержания и культивирования грибов использовали жидкую и агаризованную среды Чапека.

Изучение условий культивирования, влияющих на биосинтез хитиназы *Bacillus sp. 739*. При исследовании физико-химических факторов, влияющих на образование фермента, переменными величинами являлись кон-

центрация основного источника углерода и органического азота, содержание дополнительных источников углерода, начальное значение pH среды и температура культивирования. Влияние каждого фактора изучали независимо от остальных, которые оставались неизменными для среды описанного состава.

Очистку хитиназы *Bacillus sp. 739* проводили следующим образом. Основную фракцию фермента получали из супернатанта культуральной жидкости фракционным осаждением сульфатом аммония при 40-70% от насыщения (нас.). Для удаления избытка соли выделенный препарат подвергали гель-фильтрации на колонке с Сефадексом G-10 ("Pharmacia", Швеция), уравновешенной фосфатно-цитратным буфером (50 мМ, pH 6,0). Затем проводили аффинную сорбцию фермента на хитине. В препарат добавляли 0,5% коллоидного хитина и инкубировали на холоду при постоянном перемешивании в течение 1 ч. Затем хитин отделяли, дважды промывали фосфатно-цитратным буфером (50 мМ, pH 6,0) и ресуспендировали в нем же (в 20% от первоначального объема). Смесь инкубировали на 24 ч при 37°C. Остатки негидролизованного субстрата удаляли, а адсорбированный фермент подвергали гель-хроматографии на колонке с Биогелем P-100 («Bio-Rad», США), уравновешенной трис-HCl (50 мМ, pH 7,1). Фракции пика, имеющие хитиназную активность, лиофилизировали на установке «Иней-26». Высушенные образцы перерастворяли в небольшом объеме дистиллированной воды и подвергали электрофорезу в 7,5%-ном ПААГ с 1% ДДС-Na. Молекулярную массу гомогенных и доминирующих белков определяли с помощью калибровочной кривой, построенной по относительной подвижности группы белковых маркеров ("LKB", Швеция).

Изучение физико-химических свойств хитиназы *Bacillus sp. 739*. Основными изучаемыми характеристиками очищенного ферментного препарата являлись pH-оптимум и pH-стабильность, температурный оптимум и термостабильность, влияние pH на термостабильность. Исследовали влияние природы буфера на активность хитиназы, динамику гидролиза коллоидного хитина очищенным препаратом и зависимость активности фермента от концентрации субстрата в реакционной смеси. Изучали также субстратную специфичность об-

разцов хитиназы, различавшихся по степени электрофоретической гомогенности.

Методы исследования антигрибной активности хитиназы *Bacillus sp.*
739. Общую антагонистическую активность сырого и очищенного образцов хитиназы определяли методом лунок и агаровых блоков. Агаризованную среду Чапека разливали в чашки Петри и оставляли на сутки. Застывшую среду засеивали споровой суспензией грибов и с помощью стерильного микросверла ("ЛКВ", Швеция) вырезали в ней лунки, в которые вносили исследуемые препараты. Активность препаратов оценивали на третьи и седьмые сутки инкубации чашек (28°C) по диаметру стерильных зон в грибном газоне, образующихся вокруг лунок. Для изучения влияния фермента на скорость роста фитопатогенных грибов, прорастание спор и длину ростовых трубок, его вносили в агаризованную среду Чапека в концентрации 0,19-0,20 мг на 1,0 мл среды. После этого на чашки высевали разведением грибы и инкубировали при 28°C. Процент прорастания спор и длину ростовых трубок контрольного и опытного образцов оценивали в поле зрения светового микроскопа через 4 ч после посева при 100-кратном увеличении. Радиальный рост колоний отмечали через 96 ч после посева. Повторность экспериментов была четырехкратной. Воздействие хитиназы на прорастание спор некоторых тест-грибов изучали также в условиях жидкой среды Чапека. Для этого в стерильные пробирки Эппендорфа вносили 1 мл среды Чапека, содержащей 0,2 мг препарата хитиназы. Контрольный образец включал только среду Чапека. Оба варианта засеивали споровой суспензией *Helminthosporium sativum* и инкубировали при 28°C. Прорастание спор наблюдали в световом микроскопе (увел. х 400) после 4 часов инкубации, отмечая изменения прорастания в опытном образце по сравнению с контролем.

Литическое действие хитиназы на споры и мицелий оценивали двумя методами. В первом случае предварительно выращенный грибной мицелий собирали и дважды промывали стерильным раствором NaCl (0,9%). Промытый мицелий суспендировали в стерильной смеси, содержащей 0,9% NaCl и 25 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 6,0) (1:1). Вносили 1 мл смеси, содержащей мице-

лий в стерильные пробирки Эппендорфа с 50 мкл ферментного препарата. Контроль включал эквивалентный объем натрий-фосфатного буфера (25 мМ, pH 6,0) без ферментного препарата. Смеси инкубировали при 20°C в течение 24 ч, после чего наличие каких-либо изменений фиксировали визуально, наблюдая образцы мицелия в световой микроскоп (400-кратн. увел.). Биохимически воздействие хитиназы оценивали по динамике накопления продуктов реакции, используя в качестве субстрата высушенный мицелий некоторых тест-грибов. Для этого к 125 мг субстрата добавляли 12,5 мл раствора фермента (около 0,5 ед/мл) в фосфатно-цитратном буфере (50 мМ, pH 6,0) и инкубировали при 20°C в течение 8 ч. Каждые два часа отбирали пробы по 1 мл и определяли в них концентрацию редуцирующих сахаров феррицианидным методом по калибровочной кривой с N-ацетил-D-глюкозамином. Для некоторых тест-грибов ту же самую реакцию проводили при 37°C течение 3 ч. В этом случае пробы для анализа отбирали через каждый час. По окончании инкубации остатки мицелия отделяли и промывали центрифугированием, сушили при 105°C, измельчали и взвешивали для определения убыли в сухом весе. За 100% принимали сухой вес мицелия в контроле.

Статистическую обработку результатов осуществляли на персональном компьютере с использованием программ Excel-97 и Origin 5,0. В качестве критерия достоверности применяли критерий Стьюдента при доверительной вероятности $P=0,95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Образование хитиназы *Bacillus sp.* 739 в условиях среды стандартного состава. При выращивании на среде с 0,5% коллоидного хитина активность фермента в культуральной жидкости обнаруживалась через 12 ч от начала культивирования. Максимальный рост секреции хитиназы наблюдался в промежутке 18-36 ч. Образование внеклеточного белка и рост биомассы протекали параллельно с ростом ферментативной активности (рис. 1). В процессе культи-

вирования штамма происходило незначительное защелачивание среды. Наряду с хитиназой культура продуцировала следы N-ацетил- β -глюкозаминидазы, а также β -1,3-глюканазу и хитозаназу.

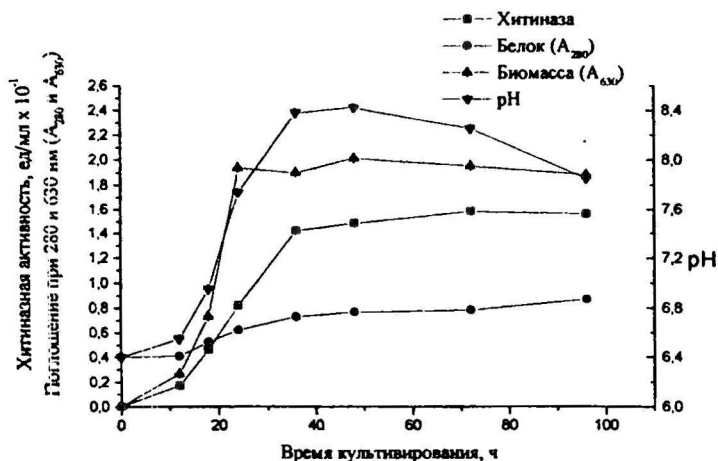


Рисунок 1. Динамика роста биомассы, синтеза хитиназы и внеклеточного белка и изменение pH среды в ходе культивирования штамма *Bacillus sp. 739* в жидкой среде с 0,5% коллоидного хитина (37°C)

Показано, что использование грибной биомассы вместо коллоидного хитина в качестве основного источника углерода приводило к значительному повышению синтеза этих ферментов, тогда как секреция хитиназы увеличивалась далеко не всегда (табл. 1). Повышенное образование β -1,3-глюканазы и хитиназы обусловлено тем, что биомасса грибов содержит непосредственные индукторы их синтеза в отличие от чистого хитина. Вместе с хитиназой эти ферменты образуют миколитический комплекс, осуществляющий разрушение клеточных стенок грибов.

Условия продукции хитиназы. На синтез хитиназы большое влияние оказывала природа основного источника углерода. Из большинства исследованных хитин-содержащих грибов только мицелий *Botrytis cinerea* значительно повышал секрецию этого фермента (примерно на 30%). Вместе с тем, предва-

рительная очистка хитин-глюканового комплекса из клеточных стенок отдельных видов грибов увеличивала выход фермента в 3-4 раза.

Таблица 1

Продукция ряда миколитических ферментов штаммом *Bacillus sp. 739* на средах с различными индукторами после 72 ч культивирования

Фермент	Активность, ед/мл		
	Коллоидный хитин из панцирей крабов, 0,5 % (в/о)	Измельченные плодовые тела гриба <i>Macrolepiota procera</i> , 0,5 % (в/о)	Коллоидный хитин (0,2%) в сочетании с коллоидным хитозаном, 0,1 % (в/о)
Хитиназа	0,158±0,003	0,089±0,003	0,203±0,003
Хитозаназа	0,058±0,003	0,255±0,003	0,347±0,003
β-1,3-глюканаза	2,41±0,01	5,67±0,01	4,27±0,01

Скорость и уровень секреции хитиназы *Bacillus sp. 739* снижались на 30 и 40%, соответственно, при использовании кристаллического (нативного) хитина вместо коллоидного в качестве основного источника углерода. Мономер хитина, N-ацетилглюкозамин, индуцировал следовые количества хитиназы. Максимум хитиназной активности наблюдался при содержании коллоидного хитина в среде 0,4%, но линейное увеличение синтеза фермента имело место только в области возрастания концентрации субстрата от 0 до 0,1%. Из дополнительных источников углерода повышенное образование хитиназы вызывали некоторые сложные полимеры (пектин, крахмал, хитозан и т.д.). Легкоусвояемые источники углерода, в том числе N-ацетилглюкозамин, начинали заметно угнетать синтез фермента при концентрации в среде 0,1-0,5%.

Большинство сложных органических соединений, используемых в качестве источников азота при культивировании *Bacillus sp. 739*, были взаимозаменяемы. Наибольшая продукция хитиназы происходила при наличии в питательной среде по 0,1% кукурузного экстракта и пептона. Оптимум начального pH среды для синтеза фермента культурой составлял довольно узкий интервал значений от 6,0 до 7,0. При pH 7,0-8,0 синтез хитиназы снижался на 10-20%, а при pH от 5,5 и ниже прекращался полностью. Оптимальная температура культиви-

рования, при которой обеспечивался максимальный выход хитиназы *Bacillus sp.* 739, находилась в области 28-38°C.

Очистка хитиназы *Bacillus sp.* 739. В результате проведенной очистки удельная активность фермента возросла в 56 раз. Этапы очистки представлены в таблице 2.

Таблица 2

Очистка хитиназы *Bacillus sp.* 739

Этап	Объем, мл	Хитиназа		Белок, мг	Степень очистки	Выход, %
		всего единиц	ед/мг белка			
Супернатант КЖ	500	51,000	0,017	2970	1	100
Осаждение 40-70%-ным нас. сульфатом аммония	10	33,857	0,052	645,6	3	66
Гель-фильтрация на Сефадексе С-15	42	22,176	0,120	185,1	7	44
Адсорбция на коллоидном хитине	7	12,242	0,540	22,67	32	24
Гель-хроматография на Биогеле Р-100	37	8,177	0,961	8,51	56	16

Очищенный фермент не являлся гомогенным. Различные фракции с хитиназной активностью, полученные в результате гель-хроматографии на Биогеле Р-100, концентрировали и подвергали электрофорезу в 7,5%-ном ПААГ с 1% ДДС-На. Электрофорез показал присутствие в отдельных из них гомогенных белков. Молекулярная масса двух доминирующих полос в наиболее активной фракции составляла около 70 кДа и 65 кДа. Дополнительно выявляемый гомогенный белок с хитиназной активностью имел молекулярную массу около 48 кДа (рис. 2).

Физико-химические свойства. Препарат очищенной хитиназы имел ярко выраженный рН-оптимум, равный 6,0 и был стабилен в диапазоне рН 4,0-9,0.

Степень термоинактивации фермента в данном интервале pH была примерно одинаковой после часа инкубации при 60°C, колеблясь от 70 до 80%. Для температурного профиля активности фермента было характерно наличие двух пиков – максимального, при 50°C и более низкого, при 65°C. Фермент был относительно стабилен при температуре 50-60°C, сохраняя от 70 до 80% первоначальной активности.

На активность хитиназы *Bacillus* sp. 739 значительное влияние оказывал тип аниона буферной пары, в частности, в трис-HCl буфере активность хитиназы возрастала вдвое по сравнению с фосфатными буферами. Трис-анион повышал также pH-стабильность фермента.

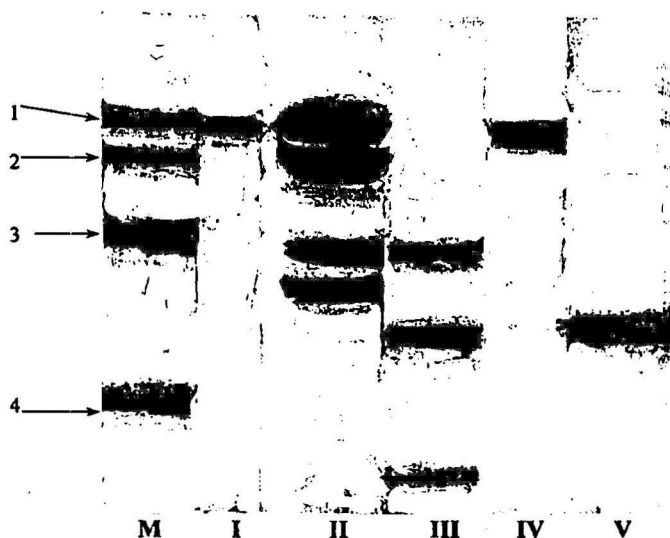


Рисунок 2. Электрофореграмма различных фракций хитиназы, полученных в результате гель-хроматографии препарата фермента, связываемого хитином, на Бюгеле Р-100. Условия: 7,5% ПААГ с 1% ДДС-Na. I, II, III, IV - номера фракций; М - маркеры: 1 - овотрансферрин (Mr 76-78,000); 2 - бычий сывороточный альбумин (Mr 66,250); 3 - овальбумин (Mr 43,000); 4 - бычья карбоангидраза (Mr 30,000) ("LKB", Швеция)

Субстратная специфичность очищенной хитиназы *Bacillus sp.* 739.

Изучение специфичности хитиназы *Bacillus sp.* 739 проводили по действию образцов фермента различной степени гомогенности на кристаллический и коллоидный хитин из панцирей краба, хитозан, а также на некоторые хромогенные производные хитоолигосахаридов (табл. 3). Самой активной была наиболее гетерогенная фракция, обозначенная в таблице под номером II. Номера фракций, представленных в таблице 3, соответствуют таковым на рисунке 2

Таблица 3

Субстратная специфичность различных фракций очищенной хитиназы *Bacillus sp.* 739

Фракция	Активность по субстрату в ферментативной реакции, ед/мл					
	Нативный хитин, 1,0%	Коллоидный хитин, 1,0%	Хитозан, 1,0%	П-НФ-GlcNAc 5 мМ	П-НФ-(GlcNAc) ₂ 5 мМ	П-НФ-(GlcNAc) ₃ 5 мМ
I	0,041±0,005	0,178±0,007	Нет	Нет	0,75±0,06	0,09±0,04
II	0,079±0,006	0,498±0,008	Нет	Нет	2,00±0,07	0,25±0,07
III	0,026±0,005	0,190±0,007	0,010	Нет	1,10±0,07	0,24±0,08
IV	-	0,047±0,005	-	Нет	0,58±0,007	0,25±0,08

Результаты исследований показали, что принципиальной разницы между фракциями фермента в специфичности гидролиза того или иного субстрата не наблюдалось. Все образцы очищенной хитиназы обладали способностью гидролизовать коллоидный хитин и п-нитрофенил-N,N'-диацетил-β-D-хитобиозу. Помимо этого, ферменты гидролизуют кристаллический хитин, но не проявляли N-ацетилглюкозаминидазной активности. Скорость гидролиза п-нитрацетилхитотриозы была значительно ниже, чем п-нф-диацетилхитобиозы. Таким образом, главным продуктом действия исследуемых образцов хитиназы являлась N,N'-диацетил-β-D-хитобиоза, что позволяет считать основным компонентом хитинолитического комплекса *Bacillus sp.* 739 хитобиозидазу, фермент с экзо-механизмом действия. Об экзо-механизме действия исследуемых образцов свидетельствует и то, что они способны расцеплять кристаллический хитин. Динамика гидролиза коллоидного хитина наиболее активным препара-

том очищенной хитиназы (фракция II) имела линейный характер в течение первых часов инкубации, что также свойственно только экзо-хитиназам.

Антагонистическая активность хитиназы *Bacillus sp.* 739. Для изучения антигрибной активности хитиназы использовали три препарата фермента, различавшиеся по степени очистки. В качестве сырого препарата брали фермент, осажденный из супернатанта культуральной жидкости сульфатом аммония (40-70% от насыщения) и диализованный. Кроме него использовали частично очищенный препарат фермента (полученный в результате адсорбции на хитине) и высокоочищенную хитиназу (после всех этапов очистки) (табл. 2). Показано, что сырой ферментный препарат проявлял антагонистическую активность по отношению к тестируемым фитопатогенным грибам. У высокоочищенной хитиназы такая активность отсутствовала (табл. 4).

Таблица 4

Антагонистическая активность сырого и высокоочищенного препаратов хитиназы *Bacillus sp.* 739 к 3 суткам инкубации

Тест-объект	Диаметр зоны ингибирования роста грибов вскруг лунки с препаратом, мм		
	1	2	3
<i>F. solani</i>	7,0±0,5	0	0
<i>F. oxysporum</i>	8,0±0,5	0	0
<i>F. culmorum</i>	8,0±0,5	0	0
<i>H. sativum</i>	6,0±0,5	0	0
<i>Alt. alternata</i>	6,0±0,5	0	0

Примечание: 1- препарат сырой хитиназы (~0,160 ед); 2 - 56-кратно очищенная хитиназа после концентрирования (~0,138 ед); 3- препарат, полученный на основе среды с 0,5% крахмала (0 ед), приведен в качестве контрольного образца, не имеющего хитиназной активности.

Тем не менее, анализ антагонистической активности культуры, основанный на методе агаровых блоков, показал, что в среде с коллоидным хитином, в отличие от среды с крахмалом у *Bacillus sp.* 739 индуцируется синтез антигрибного фактора (табл. 4). Это вещество характеризуется термолабильностью и способно, по-видимому, адсорбироваться на хитине (табл. 5). Однако, оно не

идентифицируется с хитиназой, так как очищенный фермент не обладал анти-грибной активностью.

Таблица 5

**Антагонистическая активность различных препаратов хитиназы
Bacillus sp. 739 в чашках на третьи сутки инкубации при 28°C**

Тестируемый препарат хитиназы	Диаметр зон подавления, мм				
	<i>F. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>H. sativum</i>	<i>Altern. alternata</i>
1	7,0	8,0	8,0	6,0	6,0
2	10,0	12,0	10,0	9,0	12,0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	22,0	17,0	14,0	24,0	14,0

1-3 – Сырая концентрированная хитиназа *Bacillus sp. 739* (40-70% нас. сульфатом аммония); 1 – 50 мкл (~0,169 ед), 2 – 100 мкл (~0,339 ед), 3 – 50 мкл препарата после термообработки (100°C).

4-5 – Тот же препарат после адсорбции на коллоидном хитине; 4 – 50 мкл фракции, не адсорбированной на хитине (~0,010 ед); 5 – 50 мкл адсорбированной на хитине фракции (~0,087 ед) вместе с продуктами гидролиза коллоидного хитина).

Влияние хитиназы на прорастание спор и радиальный рост колоний фитопатогенных грибов. Как и в случае антагонистической активности, воздействие на развитие грибного мицелия из спор различалось для сырого и очищенного препаратов хитиназы. Внесение 0,2 мг высокоочищенного фермента в расчете на 1,0 мл агара Чапека не оказывало ингибирующего эффекта на процессы роста грибов. Однако сырой препарат, взятый в той же концентрации, воздействовал на отдельные виды тест-грибов. Он незначительно подавлял прорастание спор *Helminthosporium sativum* (около 10%) и замедлял удлинение прорастающих гиф гриба на 30-40%. У *Alternaria alternata* эти показатели составляли, соответственно, 35-46% и 25-34%. В жидкой среде Чапека воздействие препарата на прорастание спор *H. sativum* выражалось более ярко, чем на твердой (рис. 3).

Из всех тест-грибов только у этого вида наиболее сильно подавлялся радиальный рост колоний в чашках под действием неочищенной хитиназы (на 35-46%). Таким образом, сравнительное исследование антигрибной активности сырого и высокоочищенного ферментов подтвердило ее отсутствие у последнего, а также наше предположение о слабой эффективности бациллярных хитиназ в очищенном состоянии.

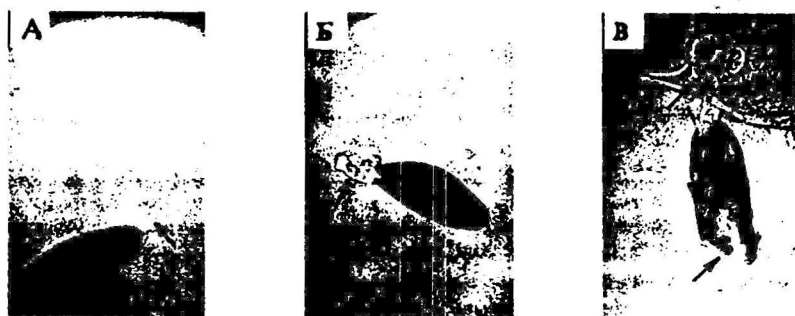


Рисунок 3. Нарушения прорастания и разрушение спор *Helminthosporium sativum* при инкубации с препаратами хитиназы *Bacillus* sp. 739 в жидкой среде Чапека. А. Контроль. Б.-В. Препараты очищенной и сырой хитиназы. 6 ч инкубации. Световая микроскопия. Увеличение $\times 400$.

Литическая активность препаратов хитиназы *Bacillus* sp. 739. Показано, что сырой и очищенный препараты фермента способны осуществлять миколитическое действие тестируемых грибов. Миколитическое действие хитиназы проявлялось в таких явлениях, как вакуолизация и разбухание мицелия, потеря им четко видимых структур и массовое разрушение гиф. Наиболее яркое проявление литического действия хитиназы на мицелий было выявлено для грибов рода *Fusarium* (рис. 4). Ферментативная природа миколитизиса, обусловленного действием хитиназы (и, возможно, β -1,3-глюканазы) на компоненты клеточных стенок грибов, подтверждалась образованием восстанавливающих сахаров в качестве продуктов реакции при инкубации живого мицелия с препаратом сырого фермента (рис. 5).

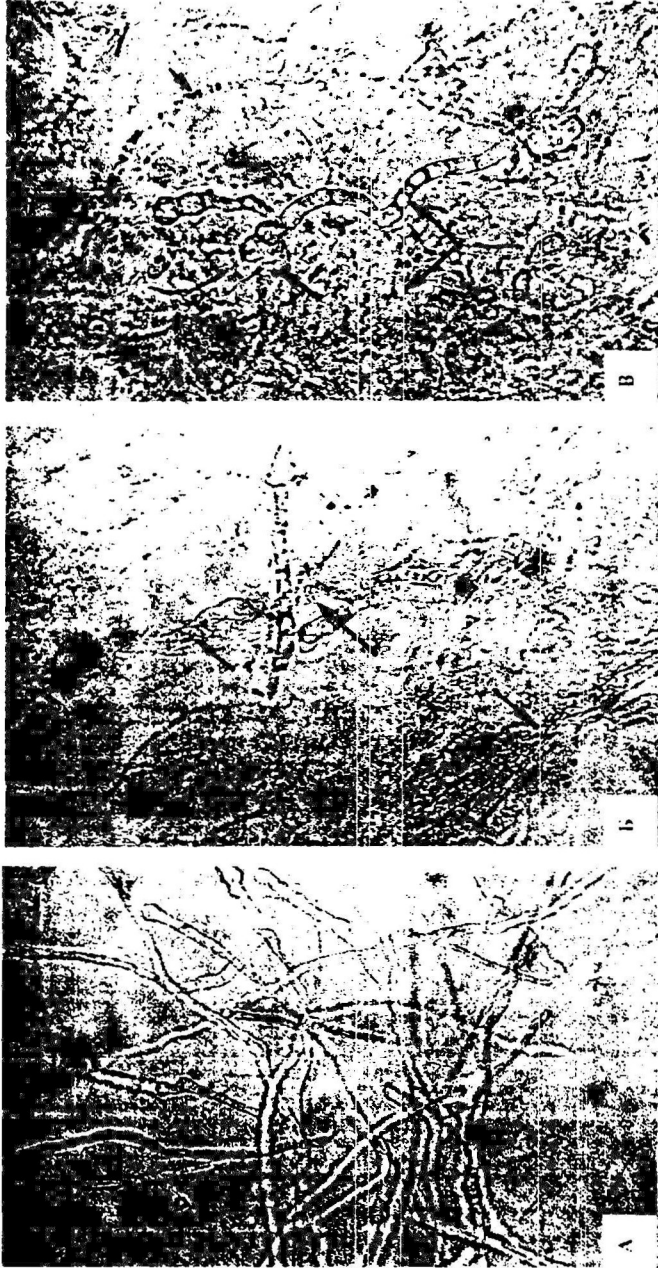


Рисунок 4. Литическое действие хитиназы *Bacillus sp. 739* на мицелий *Fusarium solani*. 24 часа выдержки при 20°C. Световая микроскопия. Увеличение $\times 400$. А. Контроль. Б. Сырой препарат. В. Частично очищенный фермент.

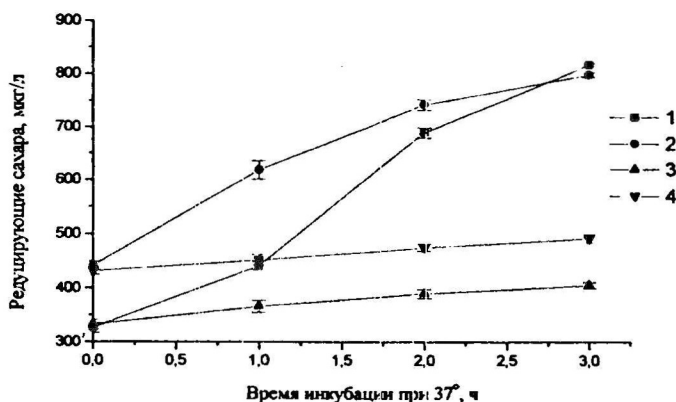


Рисунок 5. Образование редуцирующих сахаров в ходе инкубации нативного мицелия грибов *Fusarium solani* и *Alternaria alternata* с препаратом сырой хитиназы *Bacillus sp.* 739. Температура инкубации 37°C.: 1, 3 - *Fusarium solani*, опыт и контроль (без препарата), соответственно; 2, 4 - *Alternaria alternata* (опыт и контроль). Содержание хитиназы – 0,510 ед/мл инкубационной смеси (0,05 М фосфатно-цитратный буфер, pH 6,0).

Таким образом, несмотря на высокую миколитическую активность, очищенная хитиназа *Bacillus sp.* 739 не способна ингибировать ростовые процессы тестируемых фитопатогенных грибов. Антагонистическая активность штамма *Bacillus sp.* 739 обусловлена, по-видимому, образованием низкомолекулярных соединений антибиотической природы. Возможно, что хитиназа может усиливать действие подобных соединений, косвенно влияя на антагонизм *Bacillus sp.* 739 к фитопатогенным грибам.

ВЫВОДЫ

1. У штамма *Bacillus sp.* 739, - антагониста фитопатогенных грибов, обнаружена способность к продукции комплекса миколитических ферментов, включающих хитиназу (КФ. 3.2.1.14), β -1,3-глюканазу (КФ 3.2.1.6) и хитозаназу (КФ. 3.2.1.132).

2. Определены условия максимальной продукции хитиназы штаммом *Bacillus* sp. 739 в жидкой культуре. В качестве хитин-содержащего субстрата наибольший выход фермента обеспечивают мицелий гриба *Botrytis cinerea* и хитин-глюкановый комплекс из плодовых тел базидиомицетов *Armillariella mellea* и *Macrolepiota procera* в концентрациях 0,5 - 0,75 % мас.

3. Методами осаждения, аффинной сорбции и гель-хроматографии осуществлена 56-кратная очистка хитиназы *Bacillus* sp. 739. С помощью электрофореза в очищенном препарате выявлены белки с хитиназной активностью, молекулярная масса которых соответствует примерно 70,000, 65,000 и 48,000 дальтон.

4. Установлено, что хитиназа *Bacillus* sp. 739 имеет оптимум pH, равный 6,0, фермент стабилен в диапазоне pH от 4,0 до 9,0. Температурный профиль активности препарата характеризуется двумя пиками, соответствующими 50°C и 65°C. Фермент стабилен в интервале температур 50-60°C.

5. По механизму действия фермент является экзо-хитиназой (хитобиолизидозой), поскольку основным продуктом его реакции была N,N'-диацетил- β -D-хитобиоза.

6. Установлено, что высокоочищенный препарат хитиназы *Bacillus* sp. 739, в отличие от сырого препарата, не угнетает развития фитопатогенных грибов *in vitro* и не проявляет ингибирующего действия на процессы прорастания спор, удлинение ростовых трубок и радиальный рост колоний грибов.

7. Обнаружена способность высокоочищенного препарата хитиназы *Bacillus* sp. 739 разрушать нативный мицелий грибов, гидролизую хитин клеточных стенок с освобождением редуцирующих сахаров. Установлено, что миколитическая активность очищенной хитиназы напрямую не связана с антигрибной активностью штамма *Bacillus* sp. 739.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Актуганов Г.Э., Исаев Р.Ф., Мелентьев А.И., Ямалеев А.М. Эффективность хитинолитических бактерий рода *Bacillus* в подавлении фитотрофа картофеля // Микробное разнообразие: состояние, стратегия сохранения, экологические проблемы: Тезисы докладов международной конференции. – Пермь, 1996. – С. 11-12.
2. Aktuganov G.E., Isaev R.F., Melentjev A.I., Yamaleev A.I. The efficiency of chitinolytic bacteria of the genus *Bacillus* to protect phytophthora infection on potato // Microbial diversity: current situation, conservation strategy and ecological aspects: International Conference abstracts. – Perm, Russia, 1996. – P. 148-149.
3. Актуганов Г.Э., Мелентьев А.И. Конструирование жидких питательных сред для продуцентов хитиназы рода *Bacillus* на основе мицелия и плодовых тел некоторых высших грибов // Молекулярная генетика и биотехнология: Материалы статей международной конференции. - Минск, 1998. – С. 136-137.
4. Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э. Хитиназа *Bacillus sp. 739* и ее роль в биологическом контроле фитопатогенов // Молекулярная генетика и биотехнология: Материалы статей международной конференции. - Минск, 1998. – С. 228-230.
5. Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э. Хитиназа *Bacillus sp. 739*: Выделение, очистка и характеристика // Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35, № 6. – С. 624-628.



Актуганов Глеб Эдуардович

СВОЙСТВА ХИТИНАЗЫ
BACILLUS SP. 739 - АНТАГОНИСТА
ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

*Лицензия на издательскую деятельность
ЛР № 021319 от 05.01.99 г.*

Подписано в печать 24.03.2000 г. Формат 60х84/16.
Бумага офсетная. Компьютерный набор. Гарнитура Times.
Отпечатано на ризографе. Усл.печ.л. 1,38. Уч.-изд.л. 1,18.
Заказ 100. Тираж 197 экз.

*Редакционно-издательский центр Башкирского университета
Отпечатано на множительном участке Башкирского университета
450074. Уфа, ул.Фрунзе, 32. Тел.: (3472)236-710*

200